

Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas  
consumidas no Brasil**

Rodrigo Aparecido Moraes-de-Souza

Dissertação apresentada para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências. Área de concentração:  
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Piracicaba  
2007

Rodrigo Aparecido Moraes-de-Souza  
Bacharel em Ciências dos Alimentos

Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no  
Brasil

Orientador:  
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para obtenção  
do título de Mestre em Ciências. Área de  
concentração: Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.

Piracicaba  
2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Moraes-de-Souza, Rodrigo Aparecido  
Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no  
Brasil / Rodrigo Aparecido Moraes-de-Souza. - - Piracicaba, 2007.  
59 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.  
Bibliografia.

1. Antioxidantes 2. Chá 3. Compostos fenólicos 4. Flaxonoídes I. Título

CDD 663.94

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

Dedico este trabalho:

- a todos os professores do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, pelos exemplos de competência, dedicação e amizade.

- especialmente às Professoras Gilma Sturion, Marília Oetterer e Marisa d'Arce por serem símbolos de idealismo e fontes de inspiração e motivação.

- principalmente ao meu inesquecível orientador Professor Severino Alencar que trilhou "lado a lado" comigo este difícil trajeto, sendo exemplo e verdadeiro Mestre, no sentido mais amplo desta palavra.

## **Agradecimentos**

Ao Poder Supremo pela sabedoria da vida;

Aos meus muito amados pais, Juarez e Maria Helena, por serem exemplos de superação, dignidade, profissionalismo... e principalmente de amor ilimitado à família e aos filhos;

À minha avó Helena Moraes pelo carinho que sempre me deu;

Aos meus amados irmãos, Ildebrando e Vânia, por serem referências para mim;

À minha amada sobrinha Mariana por toda alegria e orgulho que me proporciona;

A toda minha família, incluindo Graziela, Luiz e Renata, por serem parte de minha história;

A todos professores e funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (e terceirizados) pelo modo que sempre me trataram, especialmente à Beatriz Giongo;

A todos professores e funcionários da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (e terceirizados) por todo apoio que recebi durante o tempo que estive neste Campus;

Ao pessoal da Fotocopiadora Luiz de Queiroz, especialmente ao Ricardo e a Gi, pela amizade que criamos durante todo este tempo;

Ao Professor Lindolpho Capellari Júnior, ao funcionário sr. Francisco, à Selma G. Pacheco que, gentilmente, me proporcionaram matéria-prima para a execução deste trabalho;

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, especialmente à técnica Ivani Moreno;

Aos meus preciosos amigos dos tempos de FEARP-USP, Rosimeire Lucas, Adailton Lino, Eduardo Prado, Adriana Cristina, especialmente ao Acacio de Jorge e à Adriana de Lima por tudo...;

Aos meus queridos Paulo César Coelho, Fabiano Teixeira, Eduardo Fraccaroli, Alexandre Pinto, Fabio Sasai, Victor Hugo, Luís Carlos Amâncio, Silvio Fornasiari, Cantídio Fernando, César Colombo, Lídia Medeiros e Tatiane Oldoni pelo que representam para mim;

Ao casal Olavo e Célia e ao seu filho Roberto, pelo apoio, respeito e carinho, e por serem exemplos de valores humanos;

Às minhas colegas de trabalho Dona Maria Helena, Helena Maria e Célia Regina pelo companheirismo;

Aos meus tão queridos amigos da I Turma de Ciências dos Alimentos, especialmente ao Marmita, à Pam, à Ravioli, à Buriti e à Açai...

A todos os alunos de Ciências dos Alimentos pelo carinho e respeito que sempre me dedicaram, especialmente à Já-Era, à Xã-dé-le, à Amãdita, ao Topo, ao Paiedi, à Sábado e ao Só-Fulia;

Aos Amendoins Xernobil, Gazela, Matrix e Mixirik;

A todos os amigos que fiz nesta Escola, especialmente àqueles que conviveram comigo na Casa do Estudante Universitário e aos meus companheiros de luta no Movimento Estudantil;

Ao Centro Acadêmico de Ciências dos Alimentos e a todos os que o compuseram pelos benefícios à formação e à colocação profissional dos cientistas de alimentos.

Finalmente, a todos aqueles que contribuíram comigo de alguma forma, mas que não foram citados.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade. Porque se tornará assim uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que se adquira um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto. A não ser assim, ele se assemelhará, com seus conhecimentos profissionais, mais a um cão ensinado do que a uma criatura harmoniosamente desenvolvida. Deve aprender a compreender as motivações dos homens, suas quimeras e suas angústias para determinar com exatidão seu lugar exato em relação a seus próximos e à comunidade. Os excessos do sistema de competição e de especialização prematura, sob o falacioso pretexto da eficácia, assassinam o espírito, impossibilitam qualquer vida cultural e chegam a suprimir os progressos nas ciências do futuro. É preciso, enfim, tendo em vista a realização de uma educação perfeita, desenvolver o espírito crítico na inteligência do jovem.”

“Tempo difícil esse em que estamos, onde é mais fácil quebrar um átomo do que um preconceito.”

Albert Einstein (físico alemão, 1879-1955)

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	10
Lista de Tabelas .....	11
Lista de Figuras.....	12
1 Introdução .....	13
2 Desenvolvimento.....	15
2.1 Revisão bibliográfica .....	15
2.1.1 Oxidação biológica e formação de espécies reativas de oxigênio .....	15
2.1.2 Danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) .....	18
2.1.3 Antioxidantes.....	20
2.1.4 Compostos fenólicos .....	21
2.1.4.1 Classificação dos compostos fenólicos .....	23
2.1.5 O chá no mundo e no Brasil – histórico e caracterização.....	30
2.1.6 Legislação de chá no Brasil.....	32
2.1.7 Compostos fenólicos e atividade antioxidante em chá.....	34
2.2 Material e métodos.....	37
2.2.1 Material vegetal e preparo das infusões.....	37
2.2.2 Determinação de teor de compostos fenólicos totais .....	38
2.2.3 Caracterização do perfil fenólico .....	39
2.2.3.1 Hidrólise dos compostos fenólicos glicosídicos.....	39
2.2.3.2 Análise de flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência .....	39
2.2.4 Avaliação da atividade antioxidante .....	40
2.2.4.1 Determinação de atividade antioxidante pelo sistema modelo $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico (BCAL).....	40
2.2.4.2 Determinação de atividade antioxidante pelo método do seqüestro do radical 2,2'-difênil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	41
2.3 Resultados e Discussão.....	42
2.3.1 Coleta das ervas e preparo das infusões .....	42



	8
2.3.2 Determinação do teor de fenólicos totais .....	44
2.3.3 Análise de flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência .....	46
2.3.4 Atividade antioxidante .....	47
2.3.4.1 Sistema modelo $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (BCAL) .....	48
2.3.4.2 Método do seqüestro do radical DPPH .....	49
3 Conclusão .....	52
REFERÊNCIAS .....	53

## RESUMO

### **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil**

Os chás destacam-se como a segunda bebida mais consumida no mundo. Além disso, seu consumo tem se modernizado, adequando-se aos anseios dos consumidores. São uma boa fonte de compostos com atividade antioxidante, os quais podem trazer benefícios à saúde humana pelo retardamento do processo de envelhecimento, assim como pela prevenção de doenças crônicas, tais como o câncer e doenças cardiovasculares. Infusões de ervas processadas e frescas foram estudadas quanto a teor de compostos fenólicos totais, perfil de flavonóides e atividade antioxidante. Os teores de compostos fenólicos totais, determinados pelo método de Folin–Ciocalteu, variaram de zero a 46,46 mg/g. Os flavonóides miricetina, quercetina e campferol foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nos chás preto, verde e de camomila. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do seqüestro do radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH) e pelo sistema modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico (BCAL), usando hidroxitolueno butilado (BHT) e  $\alpha$ -tocoferol como padrões. As maiores atividades encontradas pelo sistema modelo BCAL foram para as infusões de chá preto, mate, capim-limão, camomila e funcho, enquanto as infusões de ervas frescas apresentaram as menores atividades. Entretanto, quando a atividade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH, as infusões de ervas frescas de menta e funcho foram as que apresentaram as maiores atividades. Os chás processados que apresentaram os menores valores de IC<sub>50</sub> foram verde e preto (147,63  $\mu$ g/mL e 288,60  $\mu$ g/mL, respectivamente). Os resultados obtidos demonstraram que as infusões analisadas são boas fontes de compostos com atividade antioxidante.

Palavras-chave: Infusões de ervas, Chá, Fenólicos, Flavonóides, DPPH, Sistema modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

## ABSTRACT

### **Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil**

Teas are the second most consumed beverage in the world. Besides this, their consumption has been modernized to suit the consumers' desires. They are a good source of compounds presenting antioxidant activity, which can bring benefits to human health by retarding the process of aging, as well as by preventing chronic diseases, such as cancer and cardiovascular diseases. Processed teas and herbal infusions were studied for their total polyphenol content, flavonoid profile, and antioxidant activity. Total phenolics, determined by Folin–Ciocalteu procedure, ranged from zero to 46.46 mg/g. Flavonoids myricetin, quercetin, and kaempferol were identified and quantified by High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) in black, green, and chamomile tea. Antioxidant activity was evaluated using 2,2 Diphenyl-1-picryl-hydrazyl method (DPPH) and  $\beta$ -carotene bleaching test (BCB), with butylated hydroxytoluene (BHT) and  $\alpha$ -tocopherol as reference substances. The highest activities using BCB were found for infusions of black tea, maté, lemongrass, chamomile, and fennel, whereas fresh herbal infusions presented the lowest activities. However, when the antioxidant activity was evaluated by DPPH, fresh herbal infusions of mint and fennel presented the highest activities. Processed teas with the lowest  $IC_{50}$  values were green and black (147.63  $\mu$ g/mL and 288.60  $\mu$ g/mL, respectively). The results obtained demonstrate that the infusions analyzed are good sources of compounds presenting antioxidant activity.

Keywords: Herbal infusions; Tea; Phenolics; Flavonoids; DPPH;  $\beta$ -carotene bleaching test

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Características químicas de flavonóides .....	30
Tabela 2 - Flavonóides e suas subclasses encontrados em alguns dos principais chás brasileiros.....	35
Tabela 3 - Caracterização das espécies vegetais utilizadas no preparo das infusões...38	
Tabela 4 - Teor de compostos fenólicos totais das infusões (mg/g).....	46
Tabela 5 - Teor de flavonóides em infusões de ervas processadas (mg/g). ....	47
Tabela 6 - Atividade antioxidante pelo sistema modelo BCAL e pelo método DPPH.....	49

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Redução tetravalente do O <sub>2</sub> a água, com a entrada de quatro elétrons e quatro H <sup>+</sup> para cada molécula de oxigênio, e geração dos intermediários (1) ânion superóxido, (2) radical hidroperoxila, (3) peróxido de hidrogênio e (4) radical hidroxila. ....	16
Figura 2 - Rotas metabólicas secundárias do chiquimato e do acetato, utilizadas na síntese de compostos fenólicos. ....	22
Figura 3 - Estrutura química básica de um ácido hidroxibenzóico. ....	23
Figura 4 - Estrutura química básica de um ácido hidroxicinâmico.....	24
Figura 5 - Estrutura química básica de uma cumarina. ....	24
Figura 6 - Estrutura química básica de um flavanol. ....	26
Figura 7 - Estrutura química básica de uma antocianidina.....	26
Figura 8 - Estrutura química básica de uma flavanona. ....	27
Figura 9 - Estrutura química básica de um flavanonol (diidroflavonol). ....	27
Figura 10 - Estrutura química básica de uma flavona. ....	28
Figura 11 - Estrutura química básica de uma isoflavona.....	28
Figura 12 - Estrutura química básica de um flavonol. ....	29
Figura 13 - Aspecto das ervas processadas utilizadas para o preparo das infusões. ....	42
Figura 14 - Aspecto das ervas frescas utilizadas para o preparo das infusões.....	43
Figura 15 - Aparência das infusões de ervas processadas e frescas. ....	44

## 1 INTRODUÇÃO

Vegetais e seus derivados, dentre os quais chás ou infusões de ervas, têm sido objeto de estudos *in vitro* para se avaliar o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (ATOUI; MANSOURI; BOSKOU; KEFALAS, 2005; KULISIC; RADONIC; KATALINIC; MILOS, 2004; MOURE; CRUZ; FRANCO; DOMINGUEZ; SINEIRO; DOMINGUEZ; NUÑEZ; PARAJÓ, 2001). A importância destes estudos é justificada pelo fato de que alimentos que contêm compostos fenólicos normalmente apresentam alta atividade antioxidante, o que significa que podem ter efeitos positivos tanto na conservação da qualidade de alimentos, quanto na preservação da saúde humana quando presentes regularmente na dieta (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004). Estudos têm demonstrado que compostos fenólicos com atividade antioxidante podem retardar o envelhecimento, assim como prevenir doenças relacionadas, tais como câncer, doenças cardiovasculares e disfunções cerebrais e outros males (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; LEE; KOO; MIN, 2004; CALABRESE; GUAGLIANO; SAPIENZA; PANEBIANCO; CALAFATO; PULEO; PENNISI; MANCUSO; BUTTERFIELD; STELLA, 2007). Pela dificuldade de se avaliar a atividade antioxidante dos alimentos sobre a fisiologia e a saúde humana, torna-se necessária a identificação de indicadores correlacionados com esta propriedade biológica *in vivo*. Um dos indicadores é a quantificação e a identificação da composição fenólica, enquanto que o outro é a determinação da atividade seqüestrante de radicais livres, relacionada com o potencial redutor e o efeito do solvente sobre a eficiência do antioxidante (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

Vários trabalhos têm sido realizados com espécies utilizadas na obtenção de infusões de ervas para a caracterização de compostos fenólicos e flavonóides, bem como a determinação da atividade antioxidante. Entretanto, várias destas espécies também são utilizadas como condimentos, e neste caso, a busca por antioxidantes é realizada para conservação de alimentos e não para a avaliação de seus efeitos sobre a saúde. Independentemente do objetivo, vários destes estudos têm utilizado diferentes solventes na extração destes compostos e, como consequência pouco se sabe ainda sobre o potencial antioxidante de infusões sobre a saúde humana (TRANTAPHYLLOU; BLEKAS; BOSKOU, 2001; ATOUI; MANSOURI; BOSKOU; KEFALAS, 2005; KATALINIC; MILOS; KULISIC; JUKIC, 2006).

O chá é considerado a segunda bebida mais consumida no mundo, com consumo inferior somente ao da água (WEISBURGER, 1997). As infusões mais consumidas no mundo são aquelas obtidas da espécie *Camellia sinensis* (chá verde e preto), no entanto no Brasil e países do Cone Sul as infusões de maior importância são aquelas obtidas de mate e as chamadas infusões de ervas frescas, com destaque para a camomila, erva-cidreira, erva-doce e hortelã (BRASIL, 2006).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição fenólica e a atividade antioxidante, em termos da capacidade de seqüestro de radicais livres e de inibição da oxidação do sistema modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, de infusões de alguns dos principais chás consumidos pela população brasileira, bem como dos chás preto e verde.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Revisão bibliográfica

#### 2.1.1 Oxidação biológica e formação de espécies reativas de oxigênio

Para obtenção de energia a maioria dos organismos vivos dispõe de um processo aeróbico, a respiração. Este processo possibilita o aproveitamento máximo das moléculas alimentares energéticas, porque utiliza uma seqüência crescente em eletronegatividade ou poder oxidante, sendo o oxigênio o acceptor final de elétrons. A respiração ocorre por meio de sistemas enzimáticos que se encontram aderidos às membranas internas da mitocôndria, organela citoplasmática que apresenta como uma de suas principais características morfológicas dobramentos internos denominados de cristas. Estas cristas têm por objetivo ampliar a superfície das membranas internas, aumentando assim, a área de adesão do sistema enzimático (desidrogenase  $\Rightarrow$  flavoproteínas  $\Rightarrow$  citocromo b  $\Rightarrow$  citocromo c  $\Rightarrow$  citocromo oxidase), denominado cadeia respiratória ou cadeia de transporte de elétrons (SIGNORINI; SIGNORINI, 1993).

A seqüência oxidativa da respiração encontra-se ilustrada na figura 1 (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993, FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Pode-se notar que a cadeia respiratória produz como intermediários o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroperoxila ( $HOO\cdot$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ), compostos que podem se tornar subprodutos. Apesar da extrema eficiência do processo respiratório, aproximadamente 2% de produtos secundários em relação aos produtos finais são gerados. Estes subprodutos apresentam reatividade química superior à do oxigênio molecular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; WILHELM FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001).



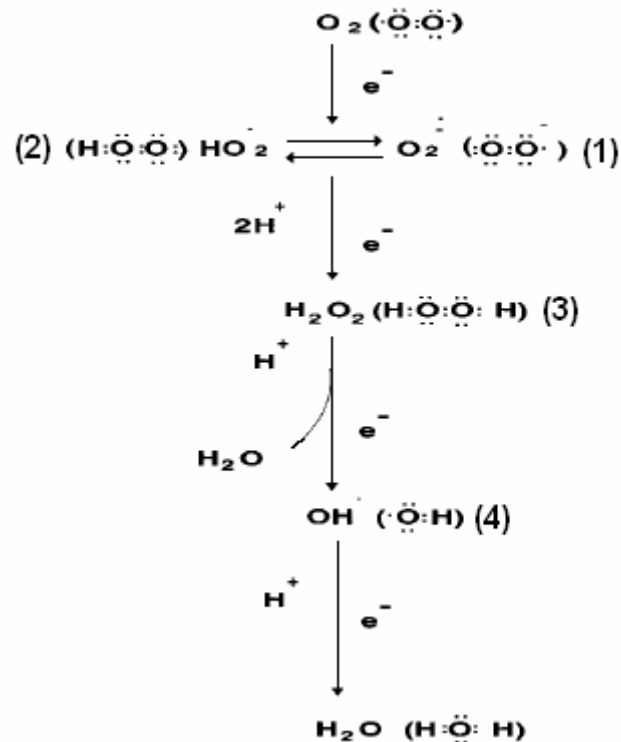


Figura 1 - Redução tetravalente do  $\text{O}_2$  a água, com a entrada de quatro elétrons e quatro  $\text{H}^+$  para cada molécula de oxigênio, e geração dos intermediários (1) ânion superóxido, (2) radical hidroperoxila, (3) peróxido de hidrogênio e (4) radical hidroxila.

Fonte: Ferreira e Matsubara (1997)

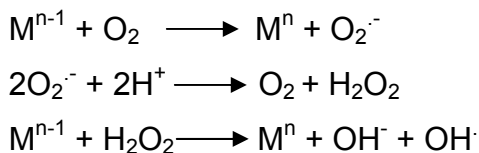
O ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroperoxila ( $\text{HOO}\cdot$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), além de compostos que não fazem parte da cadeia respiratória, como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e o radical peroxil ( $\text{ROO}\cdot$ ), recebem de forma mais adequada, a denominação de espécies reativas de oxigênio (ERO). O termo radical livre, geralmente utilizado, designa um átomo ou grupo de átomos com um elétron desemparelhado, ou seja, com um elétron ímpar em sua órbita mais externa. Portanto, entre as espécies derivadas do oxigênio molecular, somente o ânion superóxido, o radical hidroperoxila e o radical hidroxila podem ser realmente considerados radicais livres, e são representados pela adição de um ponto como índice de reatividade. O ânion superóxido recebe ainda um traço, representando o seu número de oxidação negativo. As ERO são, portanto, compostos altamente reativos que,

buscando adquirir estabilidade, durante sua breve existência, reagem com a matéria circundante, causando danos às estruturas celulares (WILHELM FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001). Isto demonstra que a respiração aeróbica é uma das principais fontes endógenas de produção de oxidantes que podem provocar danos aos organismos vivos (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993).

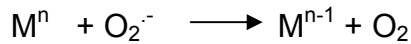
Cada um dos átomos da molécula de oxigênio  $O_2$  (oxigênio triplete), apesar de possuir em sua camada externa elétrons não emparelhados (nos orbitais  $\pi^*$ ), possui em seus orbitais externos *spins* com o mesmo sentido de rotação, o que garante à molécula certa estabilidade. Portanto, o oxigênio molecular não se caracteriza como um radical livre. Com a entrada de energia na molécula, os *spins* dos dois elétrons desemparelhados tomam sentidos opostos, num mesmo orbital, originando o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), uma espécie reativa de oxigênio (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os metais podem ter impacto na formação de espécies reativas de oxigênio. O ferro por sua abundância nos organismos vivos destaca-se como o principal agente, embora o cobre também possa ser um agente na reação de Haber-Weiss. A ação dos metais é demonstrada em dois tipos de reações: reação de Fenton e reação de Haber-Weiss.

Na reação de Fenton, o  $Fe^{+2}$  reage com oxigênio formando o  $Fe^{+3}$  e o ânion superóxido. O ânion superóxido reage com íons hidrogênio, resultando em peróxido de hidrogênio que reage novamente com o  $Fe^{+2}$ , formando o radical hidroxila.



Na reação de Haber-Weiss, o  $Fe^{+3}$  e ânion superóxido se regeneram, formando  $Fe^2$  e o  $O_2$ . O  $Fe^{+2}$  resultante reage com o peróxido de hidrogênio e forma o radical hidroxila. O peróxido de hidrogênio pode ainda reagir com o ânion superóxido, formando elementos mais estáveis como o oxigênio triplete e hidroxilas (KANNER, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).



### 2.1.2 Danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO)

A produção de ERO pode ser incrementada por fatores genéticos, genético-ambientais ou simplesmente ambientais. Entre os fatores ambientais encontram-se os exógenos tais como o fumo, a poluição atmosférica, medicamentos, o tipo de dieta, contaminantes alimentares, o excesso de cobre e/ou ferro ou de ácidos graxos poliinsaturados na dieta, a radiação ionizante e não-ionizante. Nos endógenos podemos destacar a produção de catecolaminas (sob estresse agudo ou crônico), de eicosanóides (processos inflamatórios) e a ativação da enzima xantina-oxidase (processo isquemia-reperfusão). Quanto à mitocôndria, além dos radicais livres danificarem as membranas, estes ainda podem comprometer seu material genético e a autoduplicação, pois esta organela possui DNA próprio.

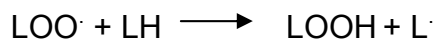
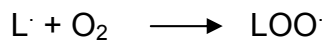
Signorini e Signorini (1993) classificaram os danos que as ERO podem causar aos organismos vivos em 5 categorias: (1) citotoxicidade ou morte celular; (2) mutagênese, devido a danos aos ácidos nucléicos ou a suas enzimas ativadoras; (3) estresse mecânico endotelial que propicia condições para a aterosclerose; (4) inativação de antiproteases e (5) desagregação de polissacarídeos no tecido conjuntivo, que gera processos degenerativos na cartilagem articular. Estes danos podem levar ao envelhecimento acelerado, câncer, doenças cardiovasculares, artrite, problemas de degeneração do sistema nervoso e diversos outros males (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; LEE; KOO; MIN, 2004; CALABRESE; GUAGLIANO; SAPIENZA; PANEBIANCO; CALAFATO; PULEO; PENNISI; MANCUSO; BUTTERFIELD; STELLA, 2007).

Um dos principais riscos das ERO aos organismos vivos é sua citotoxicidade, caracterizada como resultado da oxidação lipídica das membranas celulares. O dano às membranas celulares modifica o controle que estas exercem sobre a permeabilidade celular, desorganizando a fisiologia celular. É importante ressaltar que o mecanismo de oxidação lipídica é válido não somente para lipídios das membranas, mas também para lipídios da dieta. Este tipo de oxidação acontece em 3 fases: indução, propagação e terminação e as reações que acontecem ao longo destas fases são chamadas reações em cadeia. O processo de extrair prótons  $H^+$  de ligações insaturadas de outros ácidos graxos, caracteriza a lipoperoxidação em cadeia (LEE; KOO; MIN, 2004; CHOE; MIN, 2006).

Farmer (1942) demonstrou cada uma destas etapas da oxidação lipídica. Ela se inicia pela extração de um próton  $H^+$  de uma dupla ligação de uma cadeia alquílica, ácido graxo insaturado, por um agente iniciador (luz visível, irradiação, radiação ultravioleta, temperaturas elevadas e metais com mais de um estado de valência).



Na fase de propagação, uma molécula de  $O_2$  reage com o radical alquílico  $L\cdot$  originando o radical peróxido  $LOO\cdot$ . O radical peróxido reage com o hidrogênio de outra ligação insaturada, originando um hidroperóxido ( $LOOH$ ) mais um radical alquílico  $L\cdot$ .

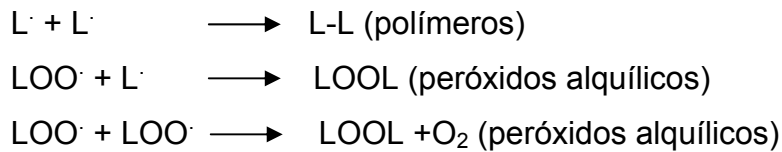


Os metais de transição podem exercer forte influência no processo, catalisando a formação de radicais lipídicos alcóxido ( $LO\cdot$ ) ou peróxido ( $LOO\cdot$ ), a partir dos hidroperóxidos, além de mais radicais  $OH\cdot$  (SIGNORINI; SIGNORINI, 1993).



Qualquer um dos radicais formados poderá reagir com outro ácido graxo insaturado, retirando-lhe um próton e formando assim um novo radical alquílico que dá continuidade à reação em cadeia.

Na fase de terminação acontece uma desaceleração da lipoperoxidação em cadeia, pois os radicais tendem a formar complexos.



### 2.1.3 Antioxidantes

Nos seres humanos existe um balanço homeostático em que mecanismos bioquímicos especiais, tanto endógenos quanto exógenos, são suficientes para neutralizar espécies reativas de oxigênio (TRIPATHI; MOHAN; KAMAT, 2007). No entanto, em alguns casos estes mecanismos podem se tornar ineficientes ou a produção destas espécies instáveis pode se tornar aumentada por fatores genéticos, genético-ambientais ou simplesmente ambientais.

Os mecanismos bioquímicos de inativação das espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser endógenos, como o sistema enzimático formado pela superóxido-dismutase (SOD), glutathiona-peroxidase e catalase, ou exógenos, que são compostos provenientes exclusivamente da dieta ou de suplementação, denominados antioxidantes, como vitaminas, minerais e outras substâncias, dentre as quais os compostos fenólicos.

No sistema enzimático, a superóxido-dismutase inativa o ânion superóxido, a glutathiona-peroxidase inativa os peróxidos lipídicos e de hidrogênio e a catalase inativa o peróxido de hidrogênio. No entanto, estes mecanismos de defesa contra as ERO no organismo humano podem ser insuficientes e os danos causados podem se tornar

cumulativos e resultar em estresse oxidativo debilitante. Por isso, torna-se essencial acrescentar à dieta alimentos que ampliem a sua capacidade de inativar estas espécies instáveis (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; LEE; KOO; MIN, 2004).

Antioxidante é qualquer substância que, presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, reduz significativamente ou previne a oxidação destas substâncias (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

Os alimentos de origem vegetal das mais variadas espécies são fontes de diversos compostos que apresentam atividade antioxidante natural (MOURE; CRUZ; FRANCO; DOMINGUEZ; SINEIRO; DOMINGUEZ; NUÑEZ; PARAJÓ, 2001). Diversos estudos têm demonstrado a importância do consumo de alimentos que contenham substâncias com atividade antioxidante para a prevenção de doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares, câncer e distúrbios cerebrais degenerativos relacionadas ao envelhecimento (CHU; CHANG; HSU, 2000; LUXIMON-RAMMA; BAHORUN; CROZIER, 2003; LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2006).

Um dos principais grupos de antioxidantes encontrados nas plantas são os compostos fenólicos, com destaque para a classe dos flavonóides. Os flavonóides, além da atividade antioxidante, também demonstram outras atividades biológicas importantes, tais como atividades antiinflamatória, antialérgica, antimicrobiana, anticarcinogênica e efeitos imunoestimulantes (NIJVELDT; VAN NOOD; VAN HOORN; BOELEN; VAN NORREN; VAN LEEUWEN, 2001). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é devida principalmente às suas propriedades redox, que permitem que eles ajam como agentes redutores ou doadores de hidrogênio. Além disso, eles também apresentam um potencial quelante de metais (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004; ATOUI; MANSOURI; BOSKOU; KEFALAS, 2005).

#### **2.1.4 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos possuem no mínimo um anel aromático em sua estrutura, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais. Estes grupos podem ser substituídos por ésteres, ésteres metílicos e glicosídeos. São amplamente distribuídos

em plantas, como produtos do metabolismo secundário, e são sintetizados por duas rotas distintas: rota do chiquimato, do qual se originam os fenilpropanóides e a rota do acetato que produz fenólicos simples. Destas rotas originam-se os flavonóides e seus derivados (Figura 2).

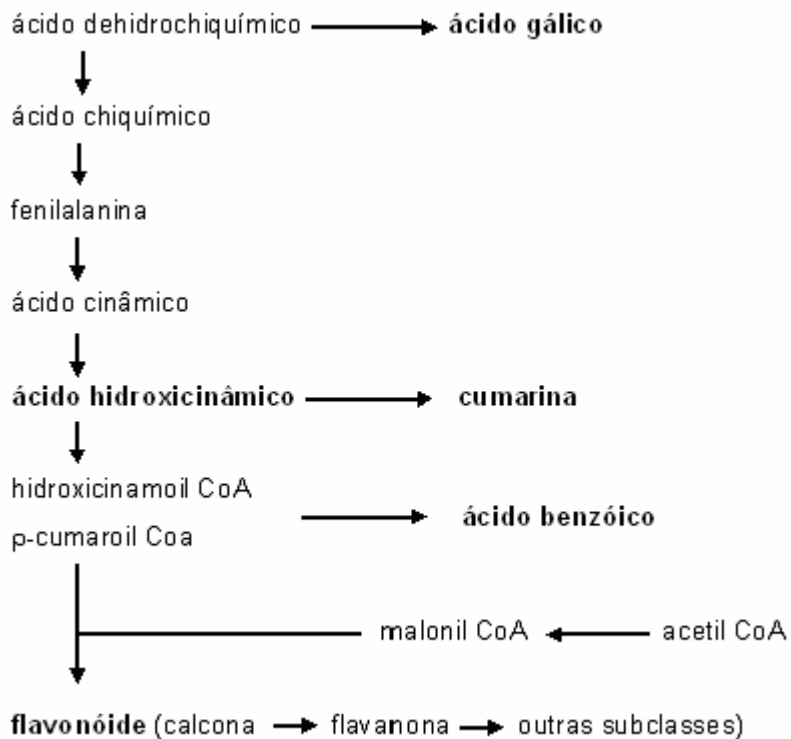


Figura 2 - Rotas metabólicas secundárias do chiquimato e do acetato, utilizadas na síntese de compostos fenólicos.

Fonte: Escarpa e Gonzáles (2001).

Os compostos fenólicos possuem estruturas químicas heterogêneas, e são encontrados nas formas livres ou conjugadas. Podem ainda ligar-se a grande variedade de substâncias naturais, principalmente monossacarídeos como a glicose, galactose, xilose e ramnose por meio de ligações glicosídicas, aumentando assim ainda mais a sua variedade química (PICCIN, 2004).

### 2.1.4.1 Classificação dos compostos fenólicos

Uma das formas de se classificar os compostos fenólicos é quanto a sua cadeia carbônica principal. Segundo esta classificação existem 4 classes principais: ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas e flavonóides, das quais derivam outras subclasses (ESCARPA; GONZÁLES, 2001; MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990).

#### Ácidos hidroxibenzóicos

Apresentam uma estrutura básica C6-C1. Caracterizam-se pela hidroxilação do carbono 4 do ácido benzóico (neste ácido R1 e R2 são substituídos por H). São os compostos fenólicos de estruturas mais simples e os mais representativos em termos de ocorrência e variedade. Desempenham funções biológicas vitais para as plantas, tais como germinação de sementes e crescimento. O ácido hidroxibenzóico mais comum é o ácido gálico (caracteriza-se pela substituição de R1 e R2 por hidroxilas) (Figura 3).

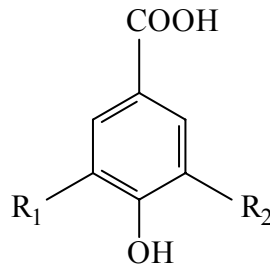


Figura 3 - Estrutura química básica de um ácido hidroxibenzóico.

#### Ácidos hidroxicinâmicos

Apresentam uma estrutura básica C6-C3 e por isso são também conhecidos como fenilpropanóides (Figura 4). Caracterizam-se pela hidroxilação do carbono 4 do



ácido cinâmico (neste ácido R1 e R2 são substituídos por H). Os mais representativos são os ácidos *p*-cumárico (caracterizam-se pela substituição de R1 e R2 por H), caféico (substituição de R1 por OH e R2 por H), ferúlico (substituição de R1 por OCH<sub>3</sub> e R2 por H) e sinápico (substituição de R1 e R2 por OCH<sub>3</sub>). As funções biológicas vitais associadas a esta classe de compostos são: inibição da germinação e do crescimento de plantas, bem como atividades antibióticas.

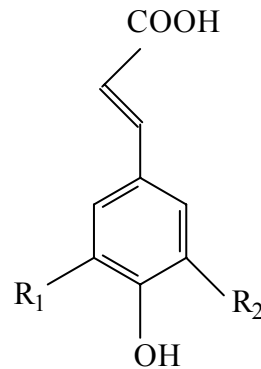


Figura 4 - Estrutura química básica de um ácido hidroxicinâmico.

## Cumarinas

Apesar de algumas cumarinas estarem presentes nos vegetais em sua forma glicosídica, a maioria delas existe na forma livre. As cumarinas estão amplamente distribuídas no reino vegetal, mas são especialmente abundantes em reduzido número de famílias, especialmente Apiaceae e Rutaceae (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990; MADARI; JACOBS, 2004). São exemplos, a cumarina em que a estrutura da figura 5 contém o R substituído por H e as umbeliferonas com OH no lugar de R.

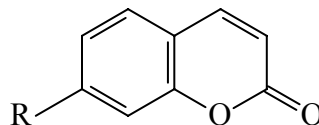


Figura 5 - Estrutura química básica de uma cumarina.

## Flavonóides

Os flavonóides são substâncias caracterizadas por apresentarem 3 anéis fundidos como unidade estrutural básica. Estes anéis estão associados às letras A, B e C, os quais recebem a numeração no sentido horário a partir do heteroátomo do oxigênio do anel C (Figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12). O anel B apresenta o mesmo sentido de contagem, diferenciando-se apenas pela atribuição de um apóstrofo a cada número. Os flavonóides são os compostos fenólicos mais comumente encontrados no reino vegetal e podem ainda ser subdivididos nas seguintes subclasses: a. flavanol (flavan-3-ol), b. antocianidina, c. flavanona, d. flavanonol (dihidroflavonol), e. flavonas, f. isoflavanona e g. flavonol, todas derivadas das chalconas. Esta subdivisão está relacionada às diferenças encontradas no anel C. Este anel pode diferenciar-se tanto pela presença de insaturações e suas posições, quanto pela presença de carbonila no carbono 4 e tipo de elemento ligado ao carbono 3 (hidroxila, hidrogênio ou fenil).

### a. flavanol (flavan-3-ol)

São os flavonóides mais encontrados na natureza. A associação dimérica entre (-)epicatequinas e (+)catequinas dá origem às procianinas. As substâncias poliméricas formadas por estes monômeros são denominadas taninos condensados ou proantocianidinas. Diferente da maioria dos flavonóides, estes não se apresentam na forma glicosilada. São caracterizados pela ligação saturada entre os carbonos 2 e 3, pela ausência de carbonila no carbono 4 e pela hidroxila ligada ao carbono 3 (Figura 6). Destacam-se as catequinas e seus derivados epicatequina, galocatequina e epigalocatequina.

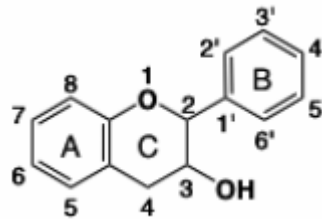


Figura 6 - Estrutura química básica de um flavanol.

Fonte: Peluso (2006)

### b. antocianidina

São os flavonóides que conferem cor a muitas espécies de frutas. Antocianinas são as formas glicosiladas de antocianidinas. Devido à sua propriedade de pigmentação, são utilizadas na indústria de alimentos como aditivos para sucos e geléias. Caracterizam-se pela ligação saturada entre carbonos 2 e 3 e pelas insaturações entre o heteroátomo de oxigênio e o carbono 2 e entre os carbonos 3 e 4; pela ausência de carbonila no carbono 4, pela hidroxila ligada ao carbono 3 e principalmente pela protonização do heteroátomo de oxigênio (Figura 7). Pode-se citar como exemplos a cianidina e a delphinidina.

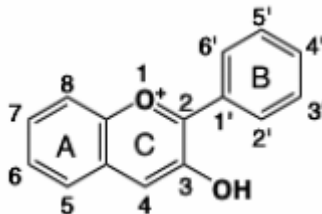


Figura 7 - Estrutura química básica de uma antocianidina.

Fonte: Peluso (2006)

### c. flavanona

É o grupo minoritário dos flavonóides. Sua presença é destacada em frutas cítricas, onde apresentam-se fundamentalmente na forma aglicona, enquanto nos

demais vegetais destacam-se as formas glicosiladas. Caracterizam-se pela ligação saturada entre carbonos 2 e 3, pela presença de carbonila no carbono 4 e pela ausência de hidroxila ligada ao carbono 3 (Figura 8). Entre as flavanonas glicosiladas, a hesperidina, a naringina (formas glicosadas de hesperetina, naringenina, respectivamente) e a narirutina são as mais comuns.

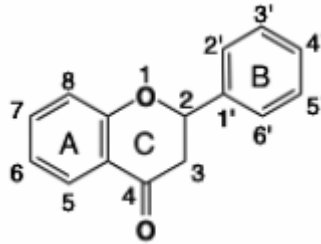


Figura 8 - Estrutura química básica de uma flavanona.

Fonte: Peluso (2006)

#### d. flavanono (diidroflavono)

Estão presentes em cascas de frutas e em vinhos brancos (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990). Caracterizam-se pela ligação saturada entre carbonos 2 e 3, pela presença de carbonila no carbono 4 e pela presença de hidroxila ligada ao carbono 3 (Figura 9). Alguns compostos desta classe são diidroquercetina ou taxifolina, diidromiricetina e diidrocampferol.

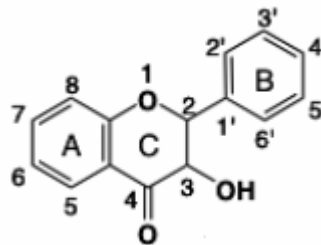


Figura 9 - Estrutura química básica de um flavanono (diidroflavono).

Fonte: Peluso (2006)

### e. flavona

Classe pouco representativa em alimentos. Caracterizam-se pela ligação insaturada entre carbonos 2 e 3, pela presença de carbonila no carbono 4 e pela ausência de hidroxila ligada ao carbono 3 (ver figura 10). Suas formas agliconas mais conhecidas são apigenina e luteolina.

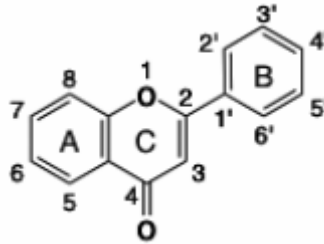


Figura 10 - Estrutura química básica de uma flavona.

Fonte: Peluso (2006)

### f. isoflavona

Grupo minoritário de flavonóides encontrados na família das leguminosas. Caracterizam-se pela ligação insaturada entre carbonos 2 e 3, pela presença de carbonila no carbono 4 e pela ligação do radical fenil (anel B) ao carbono 3 (Figura 11). Daidzeína, genisteína e gliciteína são as principais formas agliconas encontradas em soja.

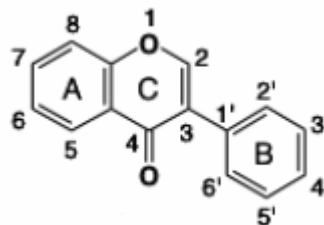


Figura 11 - Estrutura química básica de uma isoflavona.

Fonte: Peluso (2006)

### g. flavonol

É uma das subclasses de substâncias polifenólicas de maior interesse científico por suas importantes propriedades biológicas, sendo que em alguns casos podem ser encontradas na forma glicosilada. Caracterizam-se pela ligação insaturada entre carbonos 2 e 3, pela presença de carbonila no carbono 4 e pela presença de hidroxila ligada ao carbono 3 (Figura 12). Mais de 200 estruturas não glicosiladas já foram relatadas, e entre elas as mais comuns são: quercetina, campferol, miricetina e isoraminetina.

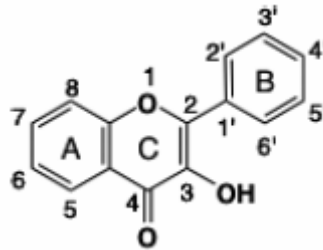


Figura 12 - Estrutura química básica de um flavonol.

Fonte: Peluso (2006)

A tabela 1 apresenta as características químicas dos principais flavonóides encontrados no reino vegetal, como número e posição de hidroxilas e tipo de substituição na molécula.

**Tabela 1 – Características químicas de flavonóides**

composto	subclasse	total de hidroxilas	posição das hidroxilas	substituição na estrutura	posição de substituição
epigalocatequina	flavanol	6	3, 5, 7, 3', 4', 5'		
galocatequina	flavanol	6	3, 5, 7, 3', 4', 5'		
catequina	flavanol	5	3, 5, 7, 3', 4'		
epicatequina	flavanol	5	3, 5, 7, 3', 4'		
delfinidina	antocianidina	6	3, 5, 7, 3', 4', 5'		
cianidina	antocianidina	5	3, 5, 7, 3', 4'		
eriodictiol	flavanona	4	5, 7, 3', 4'		
hesperetina	flavanona	3	5, 7, 3'	O-metil	4'
naringenina	flavanona	3	5, 7, 4'		
eriocitrina	flavanona	3	5, 3', 4'	O-rutnose	7
diidromiricetina	flavanonol	6	3, 5, 7, 3', 4', 5'		
diidroquercetina ou taxifolina	flavanonol	5	3, 5, 7, 3', 4'		
fustina	flavanonol	4	3, 7, 3', 4'		
diidrocampferol	flavanonol	4	3, 5, 7, 4'		
luteolina	flavona	4	5, 7, 3', 4'		
orientina	flavona	4	5, 7, 3', 4'	glicose	8
apigenina	flavona	3	5, 7, 4'		
isorhoifolina	flavona	2	5, 4'	O-rutnose	8
gardenina D	flavona	2	5, 3'	O-metil	6, 7, 8, 4'
gardenina B	flavona	1	5	O-metil	6, 7, 8, 4'
genisteina	isoflavona	3	5, 7, 4'		
daidzeína	isoflavona	2	7, 4'		
miricetina	flavonol	6	3, 5, 7, 3', 4', 5'		
quercetina	flavonol	5	3, 5, 7, 3', 4'		
campferol	flavonol	4	3, 5, 7, 4'		
patuletina	flavonol	5	3, 5, 7, 3', 4'	O-metil	6
rutina	flavonol	4	5, 7, 3', 4'	O-rutnose	3
isoramnetina	flavonol	4	3, 5, 7, 4'	O-metil	3'

Baseado em Cook e Samman (1996)

### 2.1.5 O chá no mundo e no Brasil – histórico e caracterização

O chá é a segunda bebida mais consumida no mundo, superada apenas pela água (WEISBURGER, 1997). O conceito de chá no mundo refere-se ao produto de

infusões de plantas do gênero *Camellia* sp., sendo que as variações em suas denominações são relativas ao tipo de processo que estas plantas sofrem. Chá preto, oolong e chá verde são os principais tipos de produtos obtidos desta planta e diferenciam-se pela relação que têm com um processo que recebe o nome de fermentação. No entanto este nome não reflete a realidade, pois tal processo não envolve atividade microbiológica, mas apenas a inativação enzimática. O primeiro é fermentado, o segundo semi-fermentado e o terceiro não é fermentado (apresenta inativação enzimática total) (WITTIG DE PENNA; ZUNIGA; FUENZALIDA, 2005).

Ainda segundo Weisburger (1997), a história do chá como uma bebida data do ano de 2700 a.C. na China. Da China, a tradição foi levada para o Japão no século VI. Após isto, e por um longo período, o chá foi consumido apenas pela sociedade privilegiada, tornando-se popular somente 700 anos depois. O consumo de chá se difundiu na Ásia e das colônias asiáticas para suas metrópoles (por exemplo, da Indonésia para a Holanda e da Índia para o Reino Unido), de onde em meados do século XVII os ingleses divulgaram e popularizaram a bebida para o mundo.

A produção e o consumo de chá evoluiu muito. Em 1904 o conceito de chá gelado foi criado em St Louis, EUA, e no final do mesmo século aproximadamente 75% do consumo de chá pelos norte-americanos era gelado. No Japão o chá gelado também se modernizou e popularizou, passando a ser vendido nas ruas em máquinas automáticas.

Historicamente o consumo de chá no Brasil está relacionado a práticas curativas, tendo suas origens principais nas culturas indígenas, negras e européias (SILVA; BUITRÓN; OLIVEIRA; MARTINS, 2001). No fim do século XX, o consumo da bebida no país cresceu e se modernizou, surgindo inclusive uma legislação específica, porém ainda convivendo com o comércio de espécies medicinais em feiras e o plantio em quintais para o consumo familiar.



No mundo as infusões mais consumidas são aquelas obtidas de derivados do gênero *Camellia*<sup>1</sup>, sendo no Oriente o “oolong” e o chá verde os chás preferidos. No norte da África o chá verde é o mais apreciado e em muitas outras partes do mundo o chá preto é o mais consumido. As formas de consumo variam entre os países, sendo em alguns casos consumido puro, em outros com açúcar, leite ou ainda limão.

No Brasil há uma particularidade, pois a infusão mais consumida é a de mate. Entretanto, destacam-se outros chás de espécies de plantas consideradas terapêuticas ou medicinais, como: camomila, erva-cidreira, erva-doce, hortelã, boldo e carqueja (BRASIL, 2006). A nomenclatura popular das espécies utilizadas no preparo de infusões é controvertida. Duas espécies diferentes (capim-limão e melissa, ver tabela 3) recebem popularmente o nome de erva-cidreira, o mesmo acontece com erva-doce (anis e funcho) e várias espécies recebem os nomes de hortelã e menta.

O processamento ou beneficiamento de espécies para o preparo de chás pode ser bastante diferente dependendo da espécie utilizada ou das características pretendidas. Uma etapa comum consiste na secagem que pode ocorrer por exposição ao sol, estufa, radiação entre outros. Outros processos que podem ser também utilizados são fragmentação, moagem, fermentação e tostagem (LIMA, 2004).

### 2.1.6 Legislação de chá no Brasil

A Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA nº 12 de 1978 aprovando as Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro, define:

“Chá é o produto constituído pelas folhas novas e brotos de várias espécies do gênero "Thea" (*Thea sinensis* e outras).”

---

<sup>1</sup> Este gênero atualmente engloba o gênero *Thea* que deixou de existir, pois não havia diferenças significativas entre ambos. No entanto a relação entre o antigo nome do gênero e a bebida é tão intensa que na literatura mundial encontra-se a utilização do termo Tea (chá) como sinônimo do produto obtido, exclusivamente, de infusão de espécies do gênero *Camellia*, principalmente da espécie *Camellia sinensis* L.

No entanto, a definição acima não é adequada, visto que no Brasil muitas outras infusões (e decocções) recebiam a denominação de chá. Como consequência a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, em sua Portaria SVS/MS nº 519, de 26 de junho de 1998, aprovou o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de "Chás - Plantas Destinadas à Preparação de Infusões ou Decocções", da seguinte forma:

"Chás são produtos constituídos de partes de vegetais, inteiras, fragmentadas ou moídas, obtidos por processos tecnológicos adequados a cada espécie, utilizados exclusivamente na preparação de bebidas alimentícias por infusão<sup>2</sup> ou decocção<sup>3</sup> em água potável, não podendo ter finalidades farmacoterapêuticas<sup>4</sup>."

O produto deixou de ser definido como originário somente de um gênero, esboçou-se uma descrição das formas de obtenção, preparo da bebida e surgiram restrições legais, permitindo a utilização do chá somente para a finalidade alimentar.

Sete anos mais tarde a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio de Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº. 277, de 22 de setembro de 2005, aprovou o "Regulamento Técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis", propondo a definição abaixo:

"Chá é o produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás."

---

<sup>2</sup> Infusão: método de preparação no qual a água potável, em temperatura acima de 90°C, é vertida sobre o chá que deve permanecer em repouso por tempo determinado, conforme a(s) espécie(s) vegetal(ais). (BRASIL, 1998)

<sup>3</sup> Decocção: método de preparação no qual o chá é mergulhado em água potável mantida em temperatura acima de 90°C, por tempo determinado, conforme a(s) espécie(s) vegetal(ais). (BRASIL, 1998)

<sup>4</sup> Finalidade farmacoterapêutica: finalidade de atuar como medicamento, prevenindo ou tratando doenças e/ou sintomas pela presença de substâncias ativas em concentrações suficientes para apresentação de efeitos farmacológicos. (BRASIL, 1998)

Nesta definição foram abordadas algumas tecnologias utilizadas na obtenção do produto e restringiu-se as espécies vegetais das quais o produto poderia ser obtido, no entanto não é abordada a utilização do produto para preparação de bebidas. Apesar de não constar na definição, a restrição do uso somente para fins alimentares consta na Resolução.

No Brasil, popularmente, chá tanto pode ser entendido como produto do processamento de espécies vegetais (constante na RDC 277/05), quanto pela bebida obtida por infusão ou por decocção do referido produto, de alguma planta ou de partes dela.

O "Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás" que relata 47 Espécies Vegetais para o Preparo de Chás (EVPC) foi aprovado pela Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº. 267, de 22 de setembro de 2005, considerando a necessidade de se definir as Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. Na resolução é reforçada a exclusão das espécies vegetais com finalidade medicamentosa e/ou terapêutica.

É interessante observar que Lorenzi e Matos (2002) classificaram 23, das 47 espécies citadas no Regulamento citado acima, como "plantas medicinais" pelo fato de serem utilizadas na medicina popular, também denominada caseira ou tradicional.

### **2.1.7 Compostos fenólicos e atividade antioxidante em chá**

Os chás são fontes de compostos fenólicos bioativos que conferem atividade antioxidante e outras importantes propriedades biológicas. Diversos estudos já demonstraram atividades biológicas relacionadas à composição fenólica de espécies vegetais que são utilizadas para o preparo de infusões de chás (ATOUI; MANSOURI; BOSKOU; KEFALAS, 2005; GRAMZA; KORCZAK, 2005).

Os trabalhos sobre chás começaram no Japão e na China com o chá verde, depois na Europa e nos EUA com o chá preto. A composição química e os efeitos sobre o câncer e doenças cardiovasculares dos polifenóis de chás têm sido bem estudados, segundo Weisburger (1997).

A importância dos chás e seus efeitos sobre a saúde é amplamente discutida na revisão de Zhu; Huang e Tu (2006). Em duas décadas, foram publicados na China aproximadamente 700 trabalhos de chás em quase 300 revistas.

Nas principais espécies utilizadas para o preparo de chás são encontrados compostos fenólicos de diversas classes, mas destacam-se os ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico, cumárico e cafeico) e os flavonóides. A tabela 2 apresenta alguns flavonóides encontrados em espécies vegetais amplamente utilizadas no preparo de chás.

**Tabela 2 - Flavonóides e suas subclasses encontrados em alguns dos principais chás brasileiros.**

composto	subclasse	chá verde	chá preto	mate	camomila	funcho	menta	hortelã	capim-limão
Catequina	flavanol	x	x	x					
Epicatequina	flavanol	x	x						
Epigalocatequina	flavanol	x	x	x					
Galocatequina	flavanol	x							
Eriodictiol	flavanona					x	x	x	
Naringenina	flavanona					x	x		
Eriocitrina	flavanona								
Apigenina	flavona				x	x	x	x	
Luteolina	flavona				x	x	x	x	
Isorhoifolina	flavona							x	
Orientina	flavona								x
Gardenina B e D	flavona							x	
Campferol	flavonol	x	x			x			
Isoramnetina	flavonol					x			
Miricetina	flavonol	x			x				
Quercetina	flavonol	x	x		x	x			
Rutina	flavonol								
Patuletina	flavonol				x				
Genisteina	isoflavona							x	

Chá verde e chá preto (DEL RIO; STEWART; MULLEN; BURNS; LEAN; BRIGHENTI; CROZIER, 2004), mate (CHANDRA; MEJIA, 2004), camomila (ATOUI; MANSOURI; BOSKOU; KEFALAS, 2005), funcho (BILIA; FUMAROLA; GALLORI; MAZZI; VINCIERI, 2000 e PAREJO; JAUREGUI; SANCHEZ-RABANEDA; VILADOMAT; BASTIDA, CONDINA, 2004), menta e hortelã (KOSAR; DORMAN; BASER; HILTUNEN, 2004) e capim-limão (CHEEL; THEODULOZ; RODRIGUEZ; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2005). Atoui; Mansouri; Boskou e Kefalas, 2005 encontraram miricetina em chá verde, e apigenina, gardeninas e genisteína em hortelã. Para as infusões de anis e de melissa não foram encontrados estudos sobre perfil de fenólicos.

Pela tabela 2 pode-se perceber que nas principais infusões são encontrados representantes das principais subclasses de flavonóides: flavanol, flavanona, flavona, flavonol e isoflavona.

Del Rio, Stewart, Mullen, Burns, Lean, Brighenti e Crozier (2004) analisaram o perfil fenólico dos chás verde e preto e encontraram a seguinte distribuição entre as classes: chá verde (flavanol, 77,1%, flavonol, 13,2%, ácido hidroxicinâmico, 7,6% e ácido hidrobenzóico, 2,2%), chá preto (tearrubigina, 54,8%, teaflavina, 7,3%, ácido hidroxibenzoico, 8,9%, flavonol, 8,6%, ácido hidroxicinâmico, 7,0% e flavanol, 3,3%). Esta diferença no perfil entre os dois chás, originários da mesma espécie, é explicado pelo fato de que no caso do chá verde há inativação da polifenoloxidase, o que permite a manutenção dos flavonóides em suas estruturas básicas. Enquanto que no chá preto, o processo de “fermentação” modifica compostos da classe flavanol produzindo dois novos tipos de estruturas: a tearrubigina e a teaflavina.

A atividade antioxidante das infusões pode ser afetada por vários fatores. Por estar relacionada ao teor e composição de fenólicos, a parte da planta utilizada, o estágio de amadurecimento, a colheita, a atividade da polifenoloxidase, o beneficiamento, a temperatura, o solvente e outros fatores são determinantes para o nível de atividade. Em teoria, quanto mais madura for a planta maiores serão os teores de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante (MOURE; CRUZ; FRANCO; DOMINGUEZ; SINEIRO; DOMINGUEZ; NUÑEZ; PARAJÓ, 2001).

Na Europa e no Japão foram conduzidos vários estudos para avaliação da atividade antioxidante em infusões de ervas, assim como para a quantificação dos compostos fenólicos bioativos. Destacam-se os estudos recentes sobre a avaliação da atividade antioxidante de infusões de chá verde, chá preto, hortelã, camomila, melissa, mate, funcho e capim-limão (ATOUI; MANSOURI; BOSKOU; KEFALAS, 2005; IVANOVA; GEROVA; CHERVENKOV; YANKOVA, 2005; KATALINIC; MILOS; KULISIC; JUKIC, 2006; AOSHIMA; HIRATA; AYABE, 2007). Estes trabalhos demonstram a grande importância de se analisar a atividade antioxidante e a composição fenólica na forma como esta bebida é consumida, diferentemente dos estudos realizados no

passado, onde os compostos químicos eram extraídos até a exaustão com o uso de solventes orgânicos.

## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1 Material vegetal e preparo das infusões**

As infusões foram obtidas de ervas processadas e frescas, adquiridas no período de março a abril de 2006. As ervas processadas foram obtidas no comércio local e as ervas *in natura* no Horto de Plantas Medicinais da ESALQ/USP. As ervas processadas utilizadas foram: chá preto (Kitano), chá verde (Kitano), mate (Leão), camomila (Santosflora, secagem ao sol, 07/2005), anis (Santosflora, secagem ao sol, 07/2005), funcho (Quimer, secagem ao sol, 01/2004), capim-limão (Farmácia Acorsi), melissa (Quimer, secagem em estufa, 12/2005), hortelã (Santosflora, secagem a sombra, 07/2004) e menta (Santosflora, secador com aquecimento, 10/2005), enquanto que as ervas frescas usadas foram: funcho, capim-limão, melissa, hortelã e menta, conforme descritas na tabela 3. Para as ervas frescas foram utilizadas somente as partes recomendadas pela ANVISA para o preparo de chás, não havendo nenhum beneficiamento.

O preparo das infusões foi feito pela adição de 200 mL de água destilada (equivalente a 1 xícara de chá) a aproximadamente 100°C, sobre 3 gramas de chá ou erva fresca em temperatura ambiente, por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas em algodão e armazenadas por uma semana, em frascos de vidro com tampa selante, sob refrigeração a 5 °C.

**Tabela 3 - Caracterização das espécies vegetais utilizadas no preparo das infusões.**

<b>Nome comum</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Família</b>	<b>Parte utilizada</b>
funcho	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	<i>Apiaceae</i>	frutos
anis	<i>Pimpinella anisum</i> L.	<i>Apiaceae</i>	frutos
mate	<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	<i>Aquifoliaceae</i>	folhas e talos
camomila	<i>Matricaria recutita</i> L.	<i>Asteraceae</i>	capítulos florais
melissa	<i>Melissa officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	folhas e ramos
menta	<i>Mentha arvensis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	folhas e ramos
hortelã	<i>Mentha x piperita</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	folhas e ramos
capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	<i>Poaceae</i>	folhas
chá verde	<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	<i>Theaceae</i>	folhas e talos
chá preto	<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	<i>Theaceae</i>	folhas e talos

### 2.2.2 Determinação de teor de compostos fenólicos totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais de cada infusão foi feita espectrofotometricamente de acordo com o método colorimético de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão (SINGLETON; ROSSI, 1965). Uma alíquota de 0,5 mL das infusões diluídas em água destilada na proporção 1:10 (v/v) foi transferida para um tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído em água destilada 1:10 (v/v). A mistura foi agitada e permaneceu em repouso por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 4% (p/v) e os tubos deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A absorbância foi medida a 740 nm em espectrofotômetro (UV Mini 1240, Shimadzu Co.) Os resultados de teor dos compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g).

## **2.2.3 Caracterização do perfil fenólico**

### **2.2.3.1 Hidrólise dos compostos fenólicos glicosídicos**

Antes da análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência, foi realizada a hidrólise dos flavonóides glicosídicos, forma predominantemente encontrada nestas espécies (ATOUI; MANSOURI; BOSKOU; KEFALAS, 2005), para as formas agliconas, conforme o método descrito por Toyoda, Tanaka, Hoshino, Akiyama, Tanimura, Saito (1997). Primeiramente, uma alíquota de 20 mL da infusão foi concentrada em rotaevaporador e, acrescentado 1 mL de água destilada e 1 mL de metanol para análise. Em seguida foi adicionado 1 mL da solução resultante em tubo de ensaio com tampa e acrescentado 0,25 mL de ácido clorídrico 6 M. Os tubos foram aquecidos a 90°C por 30 minutos, e em seguida resfriados em banho de gelo. A solução com os flavonóides hidrolisados teve seu volume completado para 10 mL com água destilada, e duas extrações foram realizadas com 40 e 30 mL de acetato de etila, respectivamente. Os dois extratos foram reunidos, desidratados com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrados em rotaevaporador. O resíduo resultante foi dissolvido em 600 µL de metanol, e injetado em cromatógrafo líquido de alta eficiência

### **2.2.3.2 Análise de flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência**

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa das infusões foram feitas de acordo com o método descrito por Koo, Rosalen, Cury, Ambrosano, Murata, Yatsuda, Ikegaki, Alencar, Park (2000). Vinte microlitros de cada extrato foram injetados em cromatógrafo líquido acoplado a detector de arranjo de fotodiodos a 260 nm e coluna de fase reversa Shimadzu ODS (250 x 4,6 mm), com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi água (solvente A) e metanol (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 30% do



solvente B, aumentando para 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos. A coluna foi mantida a temperatura constante de 35°C e os cromatogramas foram processados utilizando software específico Class-Vp. Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões (Extrasynthese Co.) A quantificação dos compostos identificados foi feita utilizando-se o método da padronização externa.

## **2.2.4 Avaliação da atividade antioxidante**

### **2.2.4.1 Determinação de atividade antioxidante pelo sistema modelo $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (BCAL)**

A atividade antioxidante pelo sistema modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico das infusões aquosas foi determinada conforme o método descrito por Taga, Miller e Pratt (1984), com algumas modificações. O  $\beta$ -caroteno (10mg) foi dissolvido em 100 mL de clorofórmio, de onde foi retirada uma alíquota de 3 mL e adicionada de 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi evaporado com a utilização de corrente de nitrogênio e o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 minutos. Alíquotas de 3 mL da emulsão  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foram misturadas a 50  $\mu$ L de cada infusão e incubadas em banho de água a 50°C. A oxidação da emulsão foi determinada em espectrofotômetro (UV-Mini, Shimadzu Co.) por medida da absorbância a 470 nm, após 120 minutos de incubação. A amostra controle continha 50  $\mu$ L de solvente no lugar do extrato. As substâncias de referência (BHT e  $\alpha$ -tocoferol) foram utilizadas na concentração de 90  $\mu$ g/mL.

A atividade antioxidante foi expressa como a porcentagem de inibição em relação ao controle, de acordo com a equação proposta por Kulisic, Radonic, Katalinic e Milos (2004): % inibição =  $[(A_{A(120)} - A_{C(120)}) / (A_{C(0)} - A_{C(120)})] \times 100$ , onde:  $A_{C(0)}$  era a absorbância do controle negativo no momento do preparo da solução e  $A_{C(120)}$   $A_{A(120)}$

foram as absorvâncias do controle e da amostra, respectivamente, após 120 minutos de incubação.

#### **2.2.4.2 Determinação de atividade antioxidante pelo método do seqüestro do radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH)**

A medida da atividade seqüestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Willams, Cuvelier e Berset (1995). A mistura de reação foi constituída pela adição de 0,5 mL das infusões, 3 mL de etanol e 0,3 mL da solução do radical DPPH 0,5 mM em etanol para análise. Após 45 minutos de incubação a absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 517 nm. Para cada amostra de infusão foi realizado um teste em branco, com adição de etanol em substituição à solução de DPPH 0,5 mM. As substâncias de referência (BHT e  $\alpha$ -tocoferol) foram avaliadas na concentração final de 90  $\mu$ g/mL. A atividade antioxidante foi determinada em termos porcentagem de inibição segundo a fórmula descrita por Kulisic, Radonic, Katalinic e Milos (2004): % inibição =  $[(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$ , onde:  $A_{A(t)}$  = absorvância da amostra após 45 minutos de repouso e  $A_{C(0)}$  = absorvância do controle negativo no momento do preparo da solução.

Para os 5 chás processados que apresentaram as maiores porcentagens de inibição, foi também determinado o  $IC_{50}$ , ou seja, a concentração necessária para se inibir 50% da oxidação, conforme proposto por Cheel, Theoduloz, Rodriguez e Schmeda-Hirschmann (2005). Uma curva entre a porcentagem de inibição e a concentração para cada infusão foi construída. A concentração de amostra, equivalente a 50% da absorvância do DPPH, foi calculada graficamente de acordo com o método descrito por Kulisic; Dragovic-Uzelac; Milos (2006).

## 2.3 Resultados e Discussão

### 2.3.1 Coleta das ervas e preparo das infusões

Foram adquiridas 15 amostras de ervas, sendo 10 processadas e 5 frescas. As figuras 13 e 14 ilustram o aspecto das ervas utilizadas no preparo das infusões, logo após a aquisição.

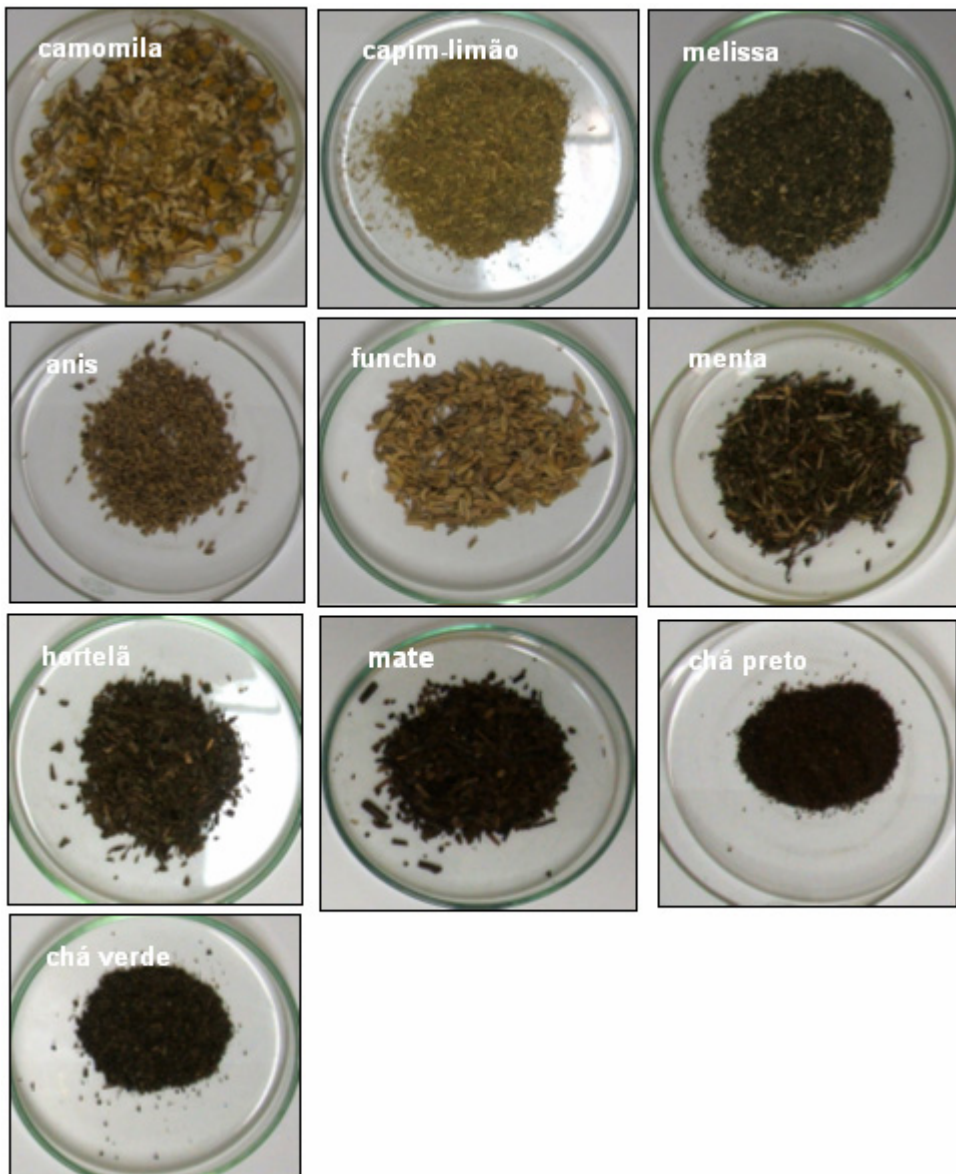


Figura 13 - Aspecto das ervas processadas utilizadas para o preparo das infusões.

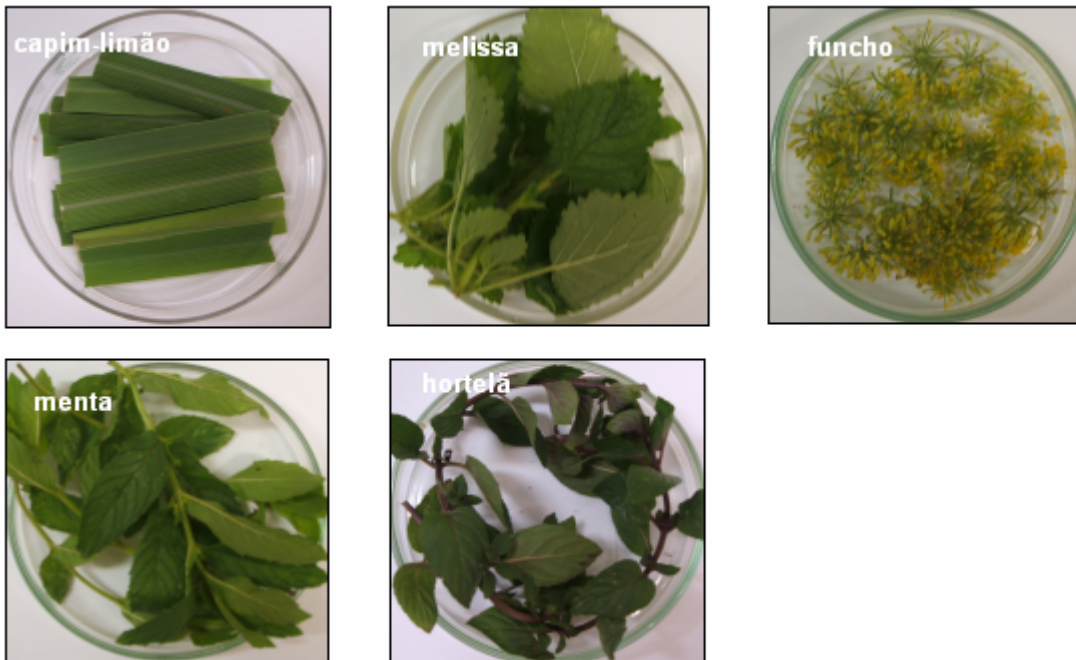


Figura 14 - Aspecto das ervas frescas utilizadas para o preparo das infusões.

A figura 15 ilustra o aspecto das infusões logo após o preparo. Como pode ser notado, as infusões das diferentes ervas mostraram uma coloração que variou do incolor ao castanho escuro. A intensidade da coloração parece estar relacionada com o processamento térmico que as ervas sofreram, pois para as mesmas espécies, as infusões obtidas de ervas frescas foram sempre mais claras.



Figura 15 - Aparência das infusões de ervas processadas e frescas.

### 2.3.2 Determinação do teor de fenólicos totais

A combinação do tempo (10 min) e temperatura inicial da infusão (100°C) utilizada neste estudo tem sido descrita por vários autores como sendo eficiente para a extração de compostos fenólicos em ervas (LIMA; MELO; LIMA, 2004; KATALINIC; MILOS; KULISIC; JUKIC, 2006; SU; DUAN; JIANG; SHI; KAKUDA, 2006).

Pode-se verificar que houve grande variação no teor de compostos fenólicos nas infusões de ervas, conforme demonstrado na tabela 4. Os valores variaram de zero a 46,46 mg/g de erva, quando analisados pelo método de Folin-Ciocalteu. Entre as infusões de ervas processadas, as que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos foram melissa, mate, chá verde, chá preto e hortelã, todas apresentando mais de 30 mg/g de erva. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Lima, Melo e Lima (2004); Atoui, Mansouri, Boskou e Kefalas, (2005) e Katalinic, Milos, Kulisic e Jukic (2006), que também encontraram uma proporção similar em termos de compostos fenólicos totais para as mesmas infusões (chá verde > chá preto > hortelã > camomila > funcho).

Entre as infusões de ervas processadas, somente as de funcho e anis apresentaram valores inferiores a 10 mg/g (tabela 4). Estas espécies, dentre as analisadas, são as únicas que pertencem à família Apiaceae (tabela 3), e cujas infusões são obtidas dos frutos. De uma maneira geral, os teores mais baixos foram encontrados nas infusões obtidas de ervas frescas, e somente melissa superou os 10 mg/g. Uma explicação para estes resultados pode ser a alta concentração de umidade presente nas ervas frescas, pois as ervas processadas sofreram o processo de secagem e, conseqüentemente, concentração dos compostos presentes.

Entretanto, é necessário considerar que vários fatores podem afetar o teor de compostos fenólicos encontrados nas infusões, tais como: forma de preparo (beneficiamento pós-colheita da planta, concentração, tempo e temperatura de infusão), erva (espécie, parte utilizada, estágio de maturação), característica do cultivo (solo, clima, estresse) e mesmo a forma de determinação experimental (MOURE; CRUZ; FRANCO; DOMINGUEZ; SINEIRO; DOMINGUEZ; NUÑEZ; PARAJÓ, 2001).

**Tabela 4 - Teor de compostos fenólicos totais das infusões (mg GAE/g).**

infusão	fenólicos totais (mg/g)**		infusão	fenólicos totais (mg/g)**
erva processada			erva fresca	
melissa	46,46±0,44 <sup>a</sup>		melissa *	17,97±0,11 <sup>n</sup>
mate	42,45±0,28 <sup>b</sup>			
chá verde	40,02±0,15 <sup>c</sup>			
chá preto	38,22±0,18 <sup>d</sup>			
hortelã	33,85±0,06 <sup>e</sup>		hortelã *	7,37±0,16 <sup>j</sup>
menta	23,96±0,25 <sup>f</sup>		menta *	9,61±0,34 <sup>i</sup>
capim-limão	20,57±0,51 <sup>g</sup>		capim-limão *	n.d.
camomila	18,07±0,76 <sup>h</sup>			
funcho	7,00±0,16 <sup>j</sup>		funcho *	3,42±0,07 <sup>l</sup>
anis	5,20±0,35 <sup>k</sup>			

Letras diferentes na mesma coluna (a-l) indicam que os valores são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ); n.d. = não detectado; \* Infusão foi obtida da erva fresca; \*\* Valores representam a média de triplicata  $\pm$  desvio padrão.

### 2.3.3 Análise de flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência

Os resultados das análises dos flavonóides identificados por CLAE estão apresentados na tabela 5. Os compostos fenólicos analisados foram os flavonóis quercetina, campferol e miricetina, pois segundo Hertog, Hollman e Venema (1992) estes são os flavonóides de maior ocorrência em folhas, frutos e outras partes aéreas de vegetais, além de possuírem forte atividade antioxidante (SALAH; MILLER; PAGANGA; TIJBURG; BOLWELL; RICE-EVANS, 1995).

A identificação e quantificação dos flavonóides foi feita apenas para as cinco infusões de chás processados que apresentaram as maiores atividades antioxidantes pelo método DPPH. Apesar do chá de anis ter apresentado alta atividade antioxidante (tabela 6), não foi identificada a presença de nenhum dos flavonóides analisados. Os compostos quercetina e miricetina foram encontrados em todas as outras ervas analisadas, sendo a quercetina o flavonóide de maior teor nestas infusões, com exceção da infusão de funcho (tabela 5). Hertog, Hollman e van de Putte (1993) também quantificaram os mesmos flavonóides em chá preto e verde encontraram a

seguinte ordem de concentração: quercetina > campferol > miricetina, ordem semelhante à verificada neste estudo.

**Tabela 5 - Teor de flavonóides em infusões de ervas processadas (mg/g).**

	miricetina	quercetina	campferol
camomila	2,01±0,18 <sup>a</sup>	2,36±0,09 <sup>c</sup>	1,01±0,01 <sup>c</sup>
chá preto	2,05±0,08 <sup>a</sup>	6,03±0,46 <sup>a</sup>	3,30±0,39 <sup>a</sup>
chá verde	2,43±0,44 <sup>a</sup>	4,92±0,57 <sup>b</sup>	2,29±0,19 <sup>b</sup>
funcho	2,30±0,21 <sup>a</sup>	1,77±0,08 <sup>c</sup>	

Valores representam a média de triplicata ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

### 2.3.4 Atividade antioxidante

O uso de modelos simplificados para a avaliação da atividade antioxidante é muito importante em estudos de determinação desta propriedade biológica em alimentos, e alguns autores têm sugerido a utilização de mais de um método *in vitro* (KOLEVA; VAN BEEK; LINSSEN; DE GROOT; EVSTATIEVA, 2002; KULISIC; RADONIC; KATALINIC; MILOS, 2004). Dos vários modelos de atividade antioxidante, tanto em termos de atividade seqüestrante de radicais quanto de inibição da oxidação em sistemas lipídicos, dois são freqüentemente utilizados por serem rápidos, sensíveis, e não exigirem equipamentos ou reagentes de difícil acesso: o método do seqüestro do radical DPPH<sup>·</sup> e o método do sistema modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (KOLEVA; VAN BEEK; LINSSEN; DE GROOT; EVSTATIEVA, 2002).

Além das vantagens citadas acima, e pelo fato da determinação da atividade antioxidante poder ser influenciada pela afinidade dos antioxidantes, o método do DPPH<sup>·</sup> tem se mostrado vantajoso, pois o resultado não é afetado pela polaridade do substrato. Entretanto, o método do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico apresenta a vantagem de considerar a efetiva oxidação lipídica no sistema (KOLEVA; VAN BEEK; LINSSEN; DE GROOT; EVSTATIEVA, 2002; BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).



Assim como na quantificação de fenólicos totais, diferenças entre os resultados da atividade antioxidante podem acontecer por diversas causas como concentração da amostra e método de determinação (seqüestro de radicais ou oxidação lipídica, tempo de reação e solvente utilizado) (MOURE; CRUZ; FRANCO; DOMINGUEZ; SINEIRO; DOMINGUEZ; NUÑEZ; PARAJÓ, 2001). Diferentes formas de obtenção dos resultados (desconto ou não da cor da amostra) e apresentação dos resultados (variação na concentração do reagente entre o início e o final da reação, % de inibição, IC<sub>50</sub>) são freqüentemente encontrados na literatura para o método DPPH, demonstrando assim dificuldades na comparação dos resultados (SAKANAKA; TACHIBANA; OKADA, 2005; ATOUI; MANSOURI; BOSKOU; KEFALAS, 2005, KULISIC; RADONIC; KATALINIC; MILOS, 2004, CHEEL; THEODULOZ; RODRIGUEZ; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2005). Outros fatores também podem acarretar variações, como qualidade dos reagentes e condições ambientais (presença ou ausência de luz) durante a realização da análise.

#### **2.3.4.1 Sistema modelo $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (BCAL)**

O sistema modelo BCAL é usualmente utilizado para se avaliar a atividade antioxidante de compostos em emulsões, acompanhando a oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno com a do ácido linoleico. Na tabela 6 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante das infusões de ervas, BHT e  $\alpha$ -tocoferol determinada pelo sistema modelo BCAL. Estatisticamente o BHT apresentou a maior atividade antioxidante (81,8%), seguido pelas infusões de chá preto, mate, capim-limão, camomila, funcho, todas com atividades semelhantes e ainda superiores às de anis e melissa. As infusões de ervas frescas apresentaram as menores atividades; a infusão de capim-limão apresentou uma porcentagem de inibição de apenas 3,0%. A atividade antioxidante do chá preto foi estatisticamente diferente da encontrada para o chá verde, porém não diferiu do chá de camomila, muito consumido no Brasil. Von Gadow, Joubert e Hansmann (1997) também analisaram a atividade antioxidante dos chás verde e preto, porém neste caso não encontraram diferenças na atividade antioxidante por esse método, o que pode ter sido devido à diferença de variedades e clima onde foram

produzidas (MOURE; CRUZ; FRANCO; DOMINGUEZ; SINEIRO; DOMINGUEZ; NUÑEZ; PARAJO, 2001).

**Tabela 6 - Atividade antioxidante pelo sistema modelo BCAL e pelo método DPPH**

infusão / padrão**	% de inibição BCAL**	% de inibição DPPH**	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
camomila	71,57±0,91 <sup>abcd</sup>	82,49±2,25 <sup>cd</sup>	1.034,00
anis	46,35±0,72 <sup>e</sup>	81,51±1,71 <sup>cd</sup>	3.343,99
chá verde	61,66±5,26 <sup>d</sup>	78,84±0,11 <sup>de</sup>	147,63
chá preto	80,57±2,82 <sup>ab</sup>	78,25±0,60 <sup>de</sup>	288,60
funcho	70,13±3,47 <sup>abcd</sup>	77,73±1,17 <sup>de</sup>	2.282,05
melissa	44,79±2,38 <sup>e</sup>	74,94±0,98 <sup>ef</sup>	
capim-limão	71,66±3,71 <sup>abcd</sup>	71,23±0,74 <sup>f</sup>	
hortelã	68,61±3,67 <sup>bcd</sup>	70,83±1,52 <sup>f</sup>	
mate	77,46±2,50 <sup>abc</sup>	68,62±0,79 <sup>fg</sup>	
menta	67,76±9,24 <sup>cd</sup>	62,83±2,90 <sup>gh</sup>	
menta *	42,82±2,49 <sup>e</sup>	88,61±0,41 <sup>b</sup>	
funcho *	29,36±4,57 <sup>f</sup>	87,83±0,56 <sup>bc</sup>	
melissa *	4,07±1,61 <sup>g</sup>	62,17±1,68 <sup>h</sup>	
hortelã *	24,34±4,96 <sup>f</sup>	41,21±0,90 <sup>i</sup>	
capim-limão *	3,03±4,639 <sup>g</sup>	21,55±6,55 <sup>j</sup>	
α-tocoferol	72,50±4,37 <sup>abcd</sup>	96,03±0,41 <sup>a</sup>	
BHT	81,77±1,18 <sup>a</sup>	20,70±2,25 <sup>j</sup>	

Letras diferentes na mesma coluna (a-j) indicam que os valores são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ); n.d. = não detectado; correlação entre fenólicos totais e IC<sub>50</sub>,  $r = -0.93$ ; correlação entre fenólicos totais e % de inibição pelo sistema modelo BCAL,  $r = 0.55$ ; Correlação entre fenólicos totais e % de inibição pelo método DPPH,  $r = 0.25$ ; Correlação entre % de inibição pelo método DPPH e IC<sub>50</sub>  $r = 0.30$ . \* Infusão foi obtida da erva fresca; \*\* Valores representam a média de triplicata ± desvio padrão. Legenda: BCAL: sistema modelo β-caroteno/ácido linoleico; DPPH: 2,2'-difênil-1-picrilhidrazil; IC<sub>50</sub>: concentração inibitória, ou seja, concentração que proporciona 50% da atividade seqüestrante pelo método DPPH, BHT: hidroxitolueno butilado.

### 2.3.4.2 Método do seqüestro do radical DPPH

A habilidade das infusões de ervas processadas e frescas em seqüestrar o radical livre DPPH· está apresentada na tabela 6. Ao contrário dos resultados encontrados para o método anterior, no método do DPPH· as infusões das ervas frescas, menta (88,6%) e funcho (87,8%), foram as que apresentaram as maiores atividades, seguidas pelo chá verde, chá preto, capim-limão, hortelã e menta (tabela 6).

Para as 5 infusões de chás processados que apresentaram as maiores atividades seqüestrantes para o radical DPPH, foi também determinado o IC<sub>50</sub>, que é a concentração que inibe 50% da oxidação, ou seja, quanto menor for o valor do IC<sub>50</sub> maior será a atividade antioxidante. De acordo com os valores de IC<sub>50</sub>, as menores concentrações foram obtidas para os chás verde e preto (147,63 e 288,60 µg/mL, respectivamente), enquanto que os chás de funcho e anis apresentaram as maiores concentrações (2.282,05 e 3.343,99, respectivamente), resultados que também corroboram os encontrados por Atoui, Mansouri, Boskou e Kefalas (2005). Apesar do chá verde apresentar valor de IC<sub>50</sub> 22 vezes menor que o de anis, estas infusões não diferiram estatisticamente quando os resultados foram expressos em termos de porcentagem de inibição (tabela 6). Da mesma forma, Kulisic, Dragovic-Uzelac e Milos (2006) também não observaram relação entre os valores de IC<sub>50</sub> e a porcentagem de inibição pelo método DPPH; pois foi encontrada eficiência de quase seis vezes em termos de IC<sub>50</sub> para a infusão de orégano sobre a de falso-tomilho, entretanto nenhuma diferença foi observada quando os resultados foram expressos em termos de porcentagem de inibição. Infusões apresentam perfis fenólicos bastante diversos e complexos, apresentando compostos de lento, moderado e rápido comportamento cinético, e de diferentes habilidades em doar elétrons, outro fator está na própria diluição dos compostos (KULISIC; DRAGOVIC-UZELAC; MILOS, 2006). A diferença nos perfis fenólicos faz com que diferentes concentrações de chás tenham diferentes habilidades em seqüestrar radicais.

De acordo com a tabela 6, pode-se observar baixa correlação entre os compostos fenólicos totais e porcentagem de inibição pelo método DPPH ( $r = 0,25$ ), enquanto que quando a correlação é feita entre fenólicos totais e IC<sub>50</sub>, uma alta relação entre as variáveis é encontrada ( $r = -0,93$ ). Resultados semelhantes foram encontrados por Katsube, Tabata, Ohta, Yamasaki, Anuurad, Shiwaku e Yamane (2004), demonstrando assim que em infusões de chá, a relação existente é entre compostos fenólicos e atividade antioxidante, dada em termos de concentração (IC<sub>50</sub>).

Os resultados deste estudo sugerem que havendo padronização na forma de preparo, obtenção e apresentação dos resultados, poderia-se classificar as infusões quanto ao seu potencial antioxidante.

### **3 CONCLUSÃO**

Pode-se concluir que as infusões de ervas analisadas possuem elevada atividade antioxidante em termos de inibição da oxidação e seqüestro de radicais livres, indicando assim possíveis benefícios à saúde quando presentes na dieta. As análises dos perfis fenólicos destas infusões demonstraram que muitas possuem elevados teores de compostos fenólicos e presença de flavonóis de alta atividade antioxidante. Além dos já reconhecidos internacionalmente, chá verde e chá preto, as infusões de camomila e funcho processadas, bastante consumidas no Brasil, apresentaram elevada inibição da oxidação pelos dois métodos estudados.

## REFERÊNCIAS

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 90, n. 17, p. 7915–7922, Sept. 1993.

AREIAS, F.M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; FERRERES, F.; SEABRA, R.M. Phenolic fingerprint of peppermint leaves. **Food Chemistry**, Barking, v. 73, n. 3, p. 307-311, May 2001.

AOSHIMA, H.; HIRATA, S.; AYABE, S. Antioxidative and anti-hydrogen peroxide activities of various herbal teas. **Food Chemistry**, Barking, v. 103, n.2, p. 617-622, 2007.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, Barking, v. 89, n. 1, p. 27-36, Jan. 2005.

BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 219, n. 6, p. 561-571, Nov. 2004.

BILIA, A.R.; FUMAROLA, M.; GALLORI, S.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Identification by HPLC-DAD and HPLC-MS analyses and quantification of constituents of fennel teas and decoctions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 10, p. 4734-4738, Oct. 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/cha.asp>> Acesso em: 20 set. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº. 267, de 22 de setembro de 2005. **Aprova o "Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás"**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2006.

\_\_\_\_\_. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº. 277, de 22 de setembro de 2005. **Aprova o "Regulamento Técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis"**. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 20 set. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA nº 12 de 1978. **Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro.** Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 20 set. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS nº 519, de 26 de junho de 1998. **Aprova o “Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Chás - Plantas Destinadas à Preparação de Infusões ou Decocções”.** Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 20 set. 2006.

CALABRESE, V.; GUAGLIANO, E.; SAPIENZA, M.; PANEBIANCO, M.; CALAFATO, S.; PULEO, E.; PENNISI, G.; MANCUSO, C.; BUTTERFIELD, D.A.; STELLA, A.G. Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: Role of vitagenes. **Neurochemical Research**, Amsterdam, v. 32, n. 4-5, 757-773, Apr. 2007.

CHANDRA, S.; de MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 11, p. 3583-3589, June 2004.

CHEEL, J.; THEODULOZ, C.; RODRÍGUEZ, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 7, p. 2511-2517, Apr. 2005.

CHOE, E.; MIN, D.B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 5, n. 4, p. 169-186, Oct. 2006.

CHU, Y.H.; CHANG, C.L.; HSU, H.F. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 5, p. 561-566, Apr. 2000.

COHEN, M.V. Free-radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury - is this the time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 111, n. 11, p. 918-931, Dec. 1989.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 7, n. 2, p. 66-76, Feb. 1996.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; MULLEN, W.; BURNS, J.; LEAN, M.E.J.; BRIGHENTI, F.; CROZIER, A. HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 10, p. 2807-2815, May 2004.

ESCARPA, A.; GONZÁLES, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Cleveland, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.

FARMER, E.H.; BLOOMFIELD, G.F.; SUNDARALINGAM, A.; SUTTON, D.A. The course and mechanism of autoxidation reaction in olefinic and polyfinic substances, including rubber. **Transactions of the Faraday Society**, London, v. 38, p. 348-356, 1942.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, jan./mar. 1997.

GRAMZA, A.; KORCZAK, J. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 16, n. 8, p. 351-358, Aug. 2005.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; van de PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, n. 8, p. 1242-1246, Aug. 1993.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D. P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, n. 9, p. 1591-1598, Sept. 1992.

IVANOVA, D.; GEROVA, D.; CHERVENKOV, T.; YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 96, n. 1-2, p. 145-150, Jan. 2005.

KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat-products - quality implications. **Meat Science**, Barking, v. 36, n. 1-2, p. 169-189, 1994.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, Barking, v. 94, n. 4, p. 550-557, Mar. 2006.



KATSUBE, T.; TABATA, H.; OHTA, Y.; YAMASAKI, Y.; ANUURAD, E.; SHIWAKU, K.; YAMANE, Y. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 8, p. 2391-2396, Apr. 2004.

KOLEVA, I.I.; van BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.H.; de GROOT, A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 13, n. 1, p. 8-17, Jan./Feb. 2002.

KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; AMBROSANO, G.M.B.; MURATA, R.M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; PARK, Y.K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants *Streptococci*. **Current Microbiology**, New York, v. 41, n. 3, p. 192-196, Sept. 2000.

KOSAR, M.; DORMAN, H.J.D.; BASER, K.H.C.; HILTUNEN, R. Screening of free radical scavenging compounds in water extracts of *Mentha* samples using a postcolumn derivatization method **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 16, p. 5004-5010, Aug. 2004.

KULISIC, T.; DRAGOVIC-UZELAC, V.; MILOS, M. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 4, p. 485-492, Oct./Dec. 2006.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 85, n. 4, p. 633-640, May 2004.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D.B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 21-33, Jan. 2004.

LIMA, V.L.A.G.; MELO, E.A.; LIMA, D.E.S. Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 187-190, jul./dez. 2004.

LIMA, U. A. Chá. In: Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U.A. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 507-523.

LIYANA-PATHIRANA, C.M.; SHAHIDI, F. Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n. 3, p. 477-485, Feb. 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 544 p.

LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, n.5, p. 496-502, Apr. 2003.

MACHEIX, J.J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 378 p.

MACHADO, A. E. H. Photodynamic therapy: principles, potential of application and perspectives. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 237-243, mar./abr. 2000.

MADARI, H.; JACOBS, R.S. An analysis of cytotoxic botanical formulations used in the traditional medicine of ancient Persia as abortifacients. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 67, n. 8, p. 1204-1210, Aug. 2004.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Barking, v. 72, n. 2, p. 145-171, Feb. 2001.

NIJVELDT, R.J.; van NOOD, E.; van HOORN, D.E.C.; BOELENS, P.G.; van NORREN, K.; van LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 74, n. 4, p. 418-425, Oct. 2001.

PAREJO, I.; JAUREGUI, O.; SANCHEZ-RABANEDA, F.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J., CONDINA, C. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 12, p. 3679-3687, June 2004.

PARR, A.; BOLWELL, G.P. Phenols in the plant and in man: the potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 7, p. 985–1012, May 2000.

PELUSO, M.R. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 231, n. 8, p. 1287-1299, Sept. 2006.

PICCIN, E. **Determinação de polifenóis totais utilizando sistemas de análises por injeção em fluxo**. 2004. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G.J.E.; KOMAITIS, M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 4, p. 1190-1195, Feb. 2005.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chemistry**, Barking, v. 89, n. 4, p. 569-575 Mar. 2005.

SALAH, N.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G.; TIJBURG, L.; BOLWELL, G.P.; RICE-EVANS, C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 322, n. 2, p. 339-346, Oct. 1995.

SILVA, S. R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L. H.; MARTINS, M. V. M. **Plantas medicinais do Brasil**: aspectos gerais sobre legislação e comércio. Dez. 2001. Disponível em: <<http://www.traffic.org/content/439.pdf>> Acesso em: 2 jun. 2007.

SINGLETON, V.L., ROSSI Jr., J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, Sept. 1965.

SIGNORINI, J.L.; SIGNORINI, S.L. **Atividade física e radicais livres**: aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo – Ícone; 1993. 160 p.

SU, X.; DUAN, J.; JIANG, Y.; SHI, J.; KAKUDA, Y. Effects of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 4, p. 348-353, June 2006.

TAGA, M.S.; MILLER, E.E.; PRATT, D.E. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 61, n. 5, p. 928-931, May 1984.

TORRES, E.A.F.S. **Alimentos do milênio**: a importância dos transgênicos, funcionais e fitoterápicos para a saúde. São Paulo: Signus, 2002, 94 p.

TOYODA, M.; TANAKA, K.; HOSHINO, K.; AKIYAMA, H.; TANIMURA, A.; SAITO, Y. Profiles of potentially antiallergic flavonoids in 27 kinds of health tea and green tea infusions. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 7, p. 2561-2564, July 1997.

TRIANANTAPHYLLOU, K.; BLEKAS, G.; BOSKOU, D. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species of *Lamiaceae*. **International Journal of Food Science and Nutrition**, London, v. 52, n. 4, p. 313-317, July 2001.

TRIPATHI, R.; MOHAN, H.; KAMAT, J.P. Modulation of oxidative damage by natural products. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, n. 1, p. 81-90, 2007.

von GADOW, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C. F. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. **Food Chemistry**, Barking, v. 60, n. 1, p. 73-77, Sept. 1997.

WEISBURGER, J.H. Tea and health: a historical perspective. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 114, p. 315-317, Mar. 1997.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 36, n. 7, p. 838-849, Apr. 2004.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 317-340.

WITTIG DE PENNA, E.; ZUNIGA, M.J., FUENZALIDA, R. Caracterización sensorial y química de la calidad de tés (*Thea sinensis*) consumidos en Chile. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 55, n. 1, p. 93-100, jan. 2005.

ZHU, Y.X.; HUANG, H.; TU Y.Y. A review of recent studies in China on the possible beneficial health effects of tea. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 333-340, Apr. 2002, 94 p.